

プロジェクト2

機能性有機物質を用いる高選択的分離分析システムの開発と その環境汚染物質分析への応用

渋谷雅美（応用分子化学科）

1. 緒言

HPLCは優れた分離分析法として広く認識され、多くの研究・産業分野で利用されているが、環境試料中の微量汚染物質の分離定量は困難であることが多く、分離選択性を大きく向上させるHPLCシステムの開発が望まれている。一方、液液抽出法は優れた濃縮分離・精製法として古くから用いられているが、その多くは有害な有機溶媒を用いる場合が多い。最近の環境問題についての社会的関心の高まりとともに、より安全で環境に負荷を与えない新たな抽出法の創出が求められている。本研究は、このような要求に基づいて、種々の機能性有機物質を分離材料として用い、特異的選択性を持つ新しい分離分析法を開発することを目的として行なった。本年度における研究経過および成果を下記の項目について報告する。

2. 多孔質グラファイトカーボンカラムの溶質保持機構

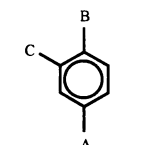
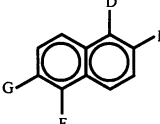
多孔質グラファイトカーボン(PGC)充填剤は、シリカゲルや有機ポリマーを基体とする化学結合型充填剤とは異なる溶質保持を示すことが知られており、また、化学的安定性や耐圧性に優れていることから一定の用途がある。当研究室ではこれまでにPGCが酸化還元性を有することを明らかにした¹⁾。これは、酸化還元反応に関与する官能基がPGCの表面に存在することによるものと推測される。一方、この研究の過程で、PGCが陰イオン交換性を有し、さらに還元剤または酸化剤でPGCを処理することにより、イオン交換容量が変化することが明らかになった²⁾。これらの現象もPGC表面の官能基が酸化還元処理によって変化することによるものと考えられる。本年度は、移動相のpHの変化によるイオン性化合物の保持挙動を調べるとともに表面増強赤外分光法(SEIRAS)によるPGCの表面分析を行って、PGCの特異的な溶質保持機構について考察した³⁾。

【実験】HPLC 測定：分離カラムは Hypercarb (4.6 x 100 mm, 7 μm)を用いた。溶離液は、HClO₄ およびアンモニア緩衝溶液を用いて所

定の pH に調整した溶液にアセトニトリルを添加したものを用いた。なお、溶離液はオンラインデガッサーで脱気し、流量 0.8 ml/min でカラムに通液した。試料化合物には、陰イオンとしてベンゼンスルホン酸イオン類とナフタレンジスルホン酸イオン類、陽イオンとしてトリアルキルベンジルアンモニウムイオン類、中性分子としてベンゼンを用いた。用いた試料化合物の構造とその略記号を Table 1 に示す。これらを溶離液で溶解して 200 ppm の試料溶液とした。検出はフォトダイオードアレイ検出器を用いて行った。

SEIRAS 測定：FT-IR 装置は Nicolet 製 Magna-IR spectrometer 550 を用い、これに ATR 装置(HARRICK 製 The Seagull™ Variable Angle Reflectance Accessory)を取り付けて測定した。プリズムは Ge に Pt 薄膜をコーティングしたものを用いた。PGC は BioTech Research 社製 BTRcarbon (粒径 3.5 μm)を用いた。PGC の酸化または還元処理は、PGC をクロマト管 (4.6 x 10 mm)に充填し、0.5 mM H₂O₂ または 10 mM Na₂SO₃ を含む 0.1 M LiClO₄ 水溶液を HPLC ポンプで 60 ml 通液して行った。その後、純水 10 ml を通液して洗浄し、100 °C に設定した乾燥機内で乾燥して測定試料とした。

Table 1 Chemical structures and labeling schemes of the model compounds

Structure	Labeling schemes			
	Acronym	A	B	C
	1,3-DBS	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻
	HBS	SO ₃ ⁻	OH	H
	MBS	SO ₃ ⁻	CH ₃	H
	EBS	SO ₃ ⁻	CH ₂ CH ₃	H
	CBS	SO ₃ ⁻	Cl	H
	VBS	SO ₃ ⁻	CH=CH ₂	H
	BZ	H	H	H
	BTMA	CH ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃	H	H
	BTEA	CH ₃ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₃	H	H
	Acronym	D	E	F
	1,5-NDS	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻
	2,6-NDS	H	SO ₃ ⁻	H

【結果と考察】Fig. 1 に酸性および塩基性の移動相における陰イオン、陽イオン、および中性化合物のクロマトグラムを示す。陰イオンは、酸性の移動相における保持が塩基性の移動相における保持に比べて大きい。また、2 価の陰イオンは、1 価の陰イオンに比べて保持の変化が大きく、1,5-NDS と EBS の溶出

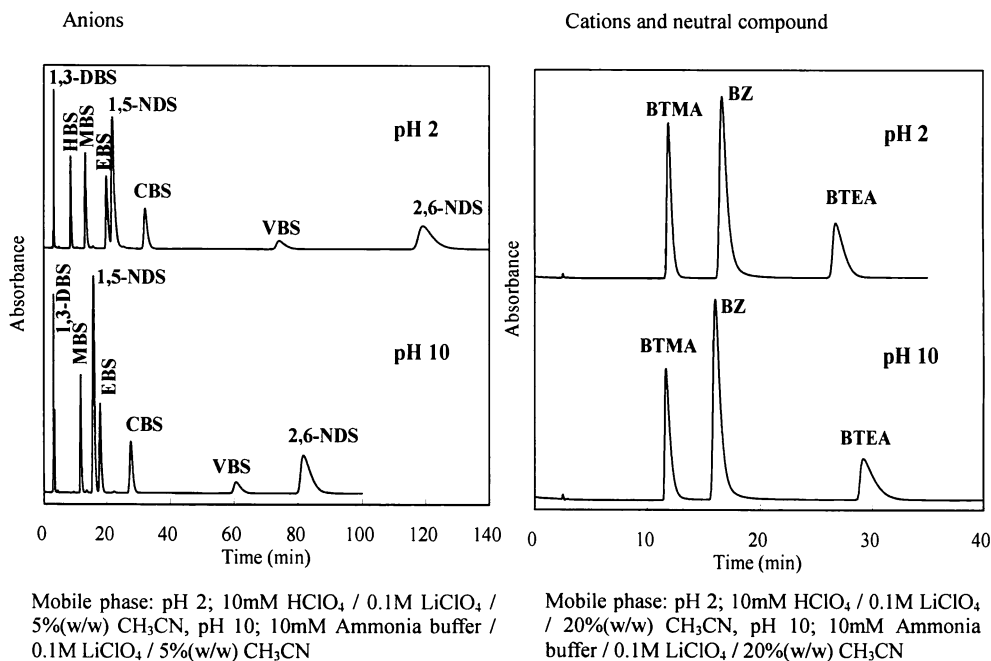


Fig. 1 Variation of chromatographic retention of aromatic sulfonate ions with pH of mobile phase

順に逆転が生じている。一方、陽イオンの保持は、陰イオンの保持と逆の挙動を示し、また、中性化合物では保持に変化が見られない。これらの結果から、移動相の pH の変化はイオン性化合物の保持に影響を及ぼすことが明らかになった。これまでの研究で、PGC 表面は陰イオン交換性²⁾および酸化還元性を有していること¹⁾や、Knox らが PGC の 0.4 mole % に反応活性部位があることを報告していること⁴⁾から、これらの反応性を示す官能基が存在すると推測される。

そこで、SEIRAS による PGC の表面分析を行った。この手法は、赤外光と金属微粒子ならびに吸着分子の相互作用により、吸着分子の吸収が飛躍的に増大することを利用した高感度表面分析法である。Fig.2 に酸化・還元処理および未処理の PGC の FT-IR スペクトルを示す。1300cm⁻¹ にピークが見られ、還元処理、未処理、酸化処理の順にピークが増大している。また、1480cm⁻¹ のピークも同じ傾向で変化している。これらのピークに対応する官能基としてカルボキシル基が考えられる。また、3300cm⁻¹ 付近のピークにも同様の変化が見られる。このピークはヒドロキシル基の OH 伸縮振動の吸収であり、特に 3550~3200cm⁻¹ の領域にあることから、このピークの変化は分子間水素結合状態の変化によるものと推測される。

以上の結果より、PGC 表面にはカルボキシル基やヒドロキシル基が存在すると考えられ、

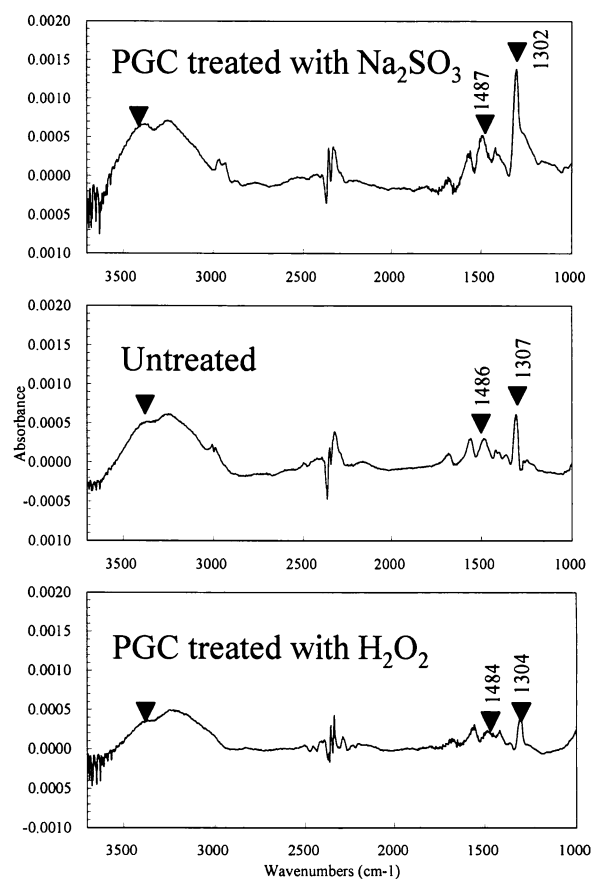


Fig. 2 Dependence of FT-IR spectra of PGC on treatment with Na₂SO₃ or

これらの官能基の存在状態がPGCの特異的な保持挙動に関与しているものと推測される。

3. 固相抽出-LC/MS による生体試料中の陽イオン性界面活性剤の分析

陽イオン界面活性剤(CS)は、衣類の柔軟仕上げ剤やヘアーリンスの主原料として使用され、殺菌消毒性があるため水生生物への影響が危惧されている。本研究では、環境水中に存在する極微量の CS の分離定量法の確立を目的とし、これまで親水性高分子ゲルカラムを用いた LC/MS システムについて検討を行ってきた。その結果、ppt レベルの検出限界を与える高感度な分析システムの構築に成功した。このシステムと、バッチ法及びオンラインでの固相抽出による試料の前濃縮の組み合わせにより、河川水中の CS の簡便かつ迅速な定量法を確立することができた。^{5,6)}本年度は、水生生物中に含まれる CS の分析法を確立することを目的として、生体試料の前処理法及び、LC/MS による分離定量法について検討を行った。分析対象としては、貝類を選択した。貝類は世界中の沿岸に広く分布し、生育場所がほぼ一定しており、大量の水をろ過するフィルターのような働きをしていることから、環境汚染物質の生体蓄積は、水域の汚染状況を如実に反映するといわれている。したがって、貝類に取り込まれた CS の分析は、生体濃縮に関する知見を与えるだけでなく、CS による海洋汚染の指標ともなりうると考えられる。今回は市販の貝を試料とし、前処理法の検討と LC/MS による定量を行った。

【実験】 CS 標準試料としては、セチルトリメチルアンモニウムイオン(CTMA)及び、トリメチルスチアールアンモニウムイオン(TMSA)を使用した。(分離カラムは、Shodex MSpak GF310 4D (4.6 mm I.D.×150 mm, 粒径 6 µm)を用いた。溶離液としては、ジ-n-ブチルアンモニウムアセテート (DBAA) を 0.8 mM 含む 0.2 M 酢酸 / 29 %アセトニトリル(DBAA 溶離液) と、4,4'-ジピリジルを 0.4 mM 含む 0.8 mM 塩酸 / 30 %アセトニトリル(ジピリジル溶離液)を使用した。検出器は Waters ZMD を使用した。イオン化はエレクトロスプレー法により行い、CS の分子イオンについてポジティブモードでの選択イオンモニタリング(SIM)により定量を行った。

貝は、市販のアサリまたはハマグリを用い、電子レンジ (500W , 1 分) で加熱または、カッターで貝柱を切開することにより殻を開いた。その後、はさみとピンセットを用いて、内臓部分とそれ以外(筋肉)の部分に分けた。これをガラス製ホモジナイザーまたは遠沈管に入れ、内部標準として 500 nM テトラデシ

ルジメチルアンモニウムイオン (TDDBA) 溶液を 100 µl 添加した後、ジピリジル溶出液 (70 % (w/v) アセトニトリル/ 4 mM 4,4'-ジピリジル/ 8 mM 塩酸) 5 ml を加えて約 5 分間ホモジナイズした。その後 3000×g で 10 分間遠心分離を行い、上清をビーカーに分取した。抽出操作は 2 回繰り返した。抽出液はアセトニトリルを蒸発除去し、超純水で約 50ml に調整した後、固相抽出カートリッジ (GL サイエンス製 GL-Pak PLS-3) を用いて固相抽出を行った。カートリッジのコンディショニングは、アセトニトリルと超純水を順にそれぞれ 5 ml 及び 10 ml 通液して行った。続いて、貝抽出液 50 ml を通液後、純水 10 ml で洗浄し、吸気乾燥を行った後、ジピリジル溶出液を用いて溶出した。溶出液中のアセトニトリルを蒸発除去した後、溶離液を用いて 5 ml 定容とした。調製した試料は、メンブランフィルター (ADVANTEC 製 DISMIC-13HP 0.45 µm) を通した後、20 µl を LC/MS に導入して測定を行った。

【結果と考察】 貝試料を加熱した場合としない場合で CS の抽出量に違いが出るかどうかを調べた。その結果、加熱処理した内臓及び筋肉からは、貝 1g あたり、それぞれ 3.4 ng と 0.2 ng の TMSA が検出されたが、加熱処理しない試料からは検出されなかった。また、CTMA は、いずれの試料からも検出されなかった。一方、内部標準として加えた TDDBA の回収率は、内臓、筋肉共に非加熱試料では、約 20%、加熱試料では約 60%であった。これらの結果より CS は貝の内臓部分に局在していること、および加熱することにより抽出量が大きくなることがわかった。そこでこれ以降は、加熱処理した内臓について分析を行った。また、加熱により CS の抽出量が大きくなる原因としては、試料中のタンパク質が熱変性することにより CS の吸着サイトとなりうる疎水性部分がタンパク質表面に露出し、CS が脱着し易くなるためと考えている。

最終的に構築した方法を用いて、標準添加法による貝内臓中の CS の定量を行った。Fig.3 に貝抽出試料の SIM クロマトグラム及び標準添加法による CS の検量線を示す。検量線は良好な直線となり、これらを用いて各 CS の定量を行った。その結果、貝 1g 中の存在量は、CTMA は 54 ng、TMSA は 401 ng となった。内部標準として添加した TDDBA の回収率は 108%であった。また、CTMA と TMSA の添加回収実験における回収率は、それぞれ

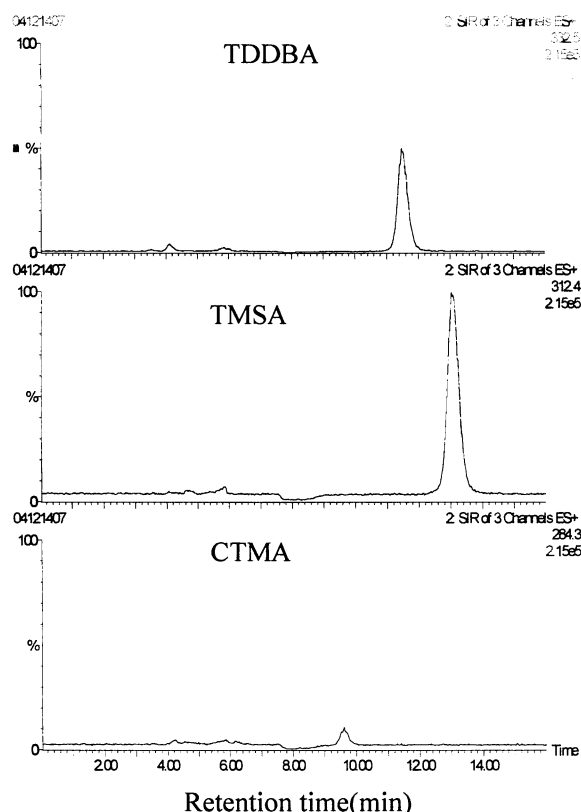


Fig.3 Chromatograms of CTMA and TMSA extracted from a shellfish sample

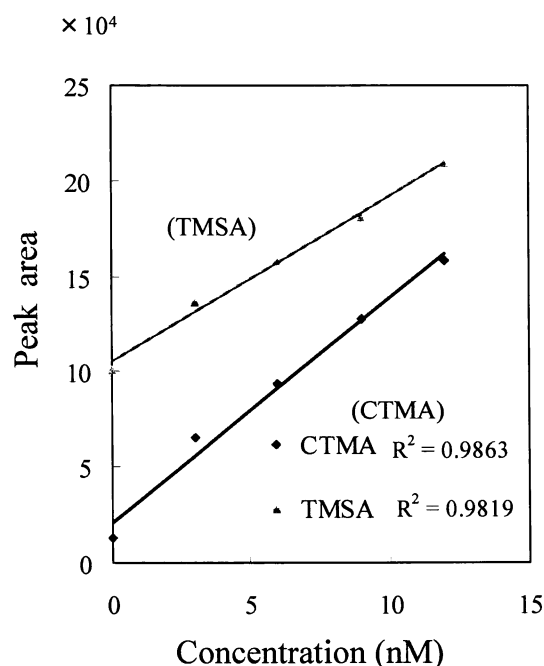


Fig. 4 Working curves of standard addition for CTMA and TMSA extracted from a shell sample

99～133%となり、ほぼ完全に抽出されていることが示唆された。CTMA が TMSA と比べて抽出量が低かったのは、アルキル鎖長の短い CTMA は生分解性が高いので、自然界に残存しにくいためであろうと考えられる。

以上の結果から、本研究で開発した固相抽出-LC/MS 法により生体試料中の CS の正確な定量が可能であることが明らかになった。今回の定量結果より、アサリによる CS の生物濃縮倍率は、海水中の CS 濃度を 0.01 nM と仮定すると、CTMA で約 17000 倍、TMSA で約 115000 倍と推定された。これより、貝体内において高度な CS の生物濃縮が起こっていることが示唆された。

4. 参考文献

- 1) M. Shibukawa, A. Unno, T. Miura, A. Nagoya, K. Oguma: On-line redox derivatization using catalytic activity of porous graphitic carbon stationary phase: an approach to enhancement of separation selectivity of liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **75**, 2775-2783 (2003).
- 2) M. Shibukawa, H. Terashima, H. Nakajima, K. Saitoh: Evaluation of the Surface Charge Properties of Porous Graphitic Carbon Stationary Phases Treated with Redox Agents, *Anaylst*, **129**, 623-628 (2004).
- 3) 齊藤和憲, 長谷川健, 渋川雅美, 第 65 回分析化学討論会講演要旨集, p228 (2004)
- 4) J. H. Knox, P. Ross, *Advances in Chromatography*, P. R. Brown nad E. Grushka, Marcel Dekker Inc., New York, 1997, vol. 37, pp. 73-119.
- 5) Atsuko Nishigaki, Chiaki Kuroiwa, Masami Shibukawa, "Characterization and Determination of Linear Alkylbenzenesulfonates in Environmental Water Samples by High-Performance Liquid Chromatography with a Hydrophilic Polymer Column and Electrospray Ionization Mass Spectrometric Detection", *Anal. Sci.*, **20**, 994 (2004).
- 6) 西垣敦子, 渋川雅美, LC/MS による陰イオン及び陽イオン界面活性剤の同時分析, 第 64 回分析化学討論会講演要旨集, p.46 (2003).